C-型咽侧体抑制素(AST-C)和促前胸腺激素释放激素(PTTH)基因在家蚕脑组织中的时空表达分析

甘 玲[1,2], 刘喜龙[1], 何宁佳[1,*]

(1. 西南大学蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715; 2. 西南大学荣昌校区动物医学系, 重庆荣昌 402460)

摘要:【目的】咽侧体抑制素在昆虫体内具有重要的调控功能。本研究比较了家蚕 *Bombyx mori* C-型咽侧体抑制素(allatostatin C, AST-C)与促前胸腺激素释放激素(prothoracicotropic hormone, PTTH)基因在不同发育阶段家蚕脑组织中转录表达的模式及其在脑组织的表达定位,以期为家蚕 *AST-C* 的功能研究提供重要的线索。【方法】利用脑组织芯片数据分析比较 AST-C 和 PTTH 基因在家蚕脑组织中的发育表达特征,RT-PCR 验证其芯片数据,分析 *AST-C* 在不同发育阶段家蚕中枢神经系统中的表达模式,并用全组织包埋原位杂交技术对 *AST-C* 和 *PTTH* 在脑组织的表达进行定位。【结果】*AST-C* 和 *PTTH* 在不同发育阶段家蚕脑组织中有相似的转录表达模式,且都在脑组织外侧一对神经分泌细胞中表达。【结论】*AST-C* 可能与 *PTTH* 以相同的转录表达模式共同参与家蚕的变态发育调控。

关键词: 家蚕; C-型咽侧体抑制素; 转录; 表达模式; 原位杂交; 时空表达模式

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2015)07-0706-06

Temporal and spatial expression analysis of allatostatin C (AST-C) and prothoracicotropic hormone (PTTH) genes in the brain of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)

GAN Ling[1,2], LIU Xi-Long[1], HE Ning-Jia[1,*] (1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Veterinary Medicine, Rongchang Campus, Southwest University, Rongchang, Chongqing 402460, China)

Abstract:【Aim】Allatostatins play important regulatory roles in insects. The transcription expression patterns of allatostatin-C (AST-C) and prothoracicotropic hormone (PTTH) genes in different developmental stages of *Bombyx mori* were compared, and their expression location in the brain was detected to supply important clues for the functional study of AST-C gene in *B. mori*.【Methods】Microarray data were analyzed to compare the developmental expression patterns of AST-C and PTTH genes. RT-PCR was conducted to corroborate the microarray data and analyze the developmental expression pattern of *AST-C* in the central nervous system. The transcription location of AST-C and PTTH genes in the brain was observed using whole mount *in situ* hybridization.【Results】The results showed that AST-C and PTTH genes shared the similar transcription pattern, and both were expressed in a pair of laterally neurosecretory cells of the brain of the silkworm.【Conclusion】AST-C and PTTH genes may be involved in the regulation of metamorphosis through the same transcription expression pattern.

Key words: *Bombyx mori*; allatostatin-C; transcription; expression pattern; *in situ* hybridization; temporal and spatial expression pattern

咽侧体抑制素(allatostatin, AST)是昆虫体内一组非常重要的神经肽,最初从蟑螂 *Diploptera punctata* 中分离,因抑制了咽侧体保幼激素的生物合成而得名(Pratt *et al*., 1989; Bendena *et al*., 1997)。之后大量咽侧体抑制素类似物已从另外几类昆虫如绿头苍蝇 *Calliphora vomitoria* (Duve *et al*.,

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201807)

作者简介: 甘玲, 女, 1978 年生, 四川资中人, 博士, 副教授, 研究方向为生物化学与分子生物学, E-mail: gl9089@sina.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hejia@swu.edu.cn

收稿日期 Received: 2015-03-09; 接受日期 Accepted: 2015-05-18

1993)、烟草天蛾 *Manduca sexta* (Kramer *et al.*, 1991) 等中分离出来。尽管这些类似物在上述昆虫中并没有抑制保幼激素生物合成的作用,但仍被归于咽侧体抑制素家族。据结构特点,咽侧体抑制素被划分为 3 组:A-型咽侧体抑制素 (AST-A)(Pratt *et al.*, 1989),B-型咽侧体抑制素 (AST-B) (Lorenz *et al.*, 1995a; 1995b)及 C-型咽侧体抑制素(AST-C)(Kramer *et al.*, 1991)。AST-A 最早从雌性太平洋折翅蠊 *Diploptera punctata* 的后脑复合体中得到分离(Pratt *et al.*, 1989; Woodhead *et al.*, 1989),而 AST-B 最初从咖啡两点蟋 *Gryllus bimaculatus* 中分离出来(Lorenz *et al.*, 1995a, 1995b)。AST-C 最早在烟草天蛾 *M. sexta* 中证实其序列为 pQVRFRQCYFNPISCF(Kramer *et al.*, 1991)。C-型咽侧体抑制素肽家族在 N 末端具有环化阻碍的结构,在 C 末端为没有环化的-PISCF 序列,而在两个内部的半胱氨酸之间有 1 个二硫桥(Stay and Tobe, 2007)。长期以来 *AST-C* 被认为仅出现在全变态的昆虫中,然而随着基因组学和转录基因组学研究的不断深入,并结合不断发展的质谱分析技术,在半变态的昆虫、介虫和螯肢动物等也发现并检测到了 AST-C 肽成员(Stay and Tobe, 2007)。结构和功能研究分析表明,无脊椎动物中 AST-C 样肽为脊椎动物生长抑素的对应物,参与了生长及发育的控制(Veenstra, 2009)。脑外侧神经分泌细胞是产生神经肽的重要位点,PTTH 已被报道在家蚕脑外侧神经分泌细胞产生(Kawakami *et al.*, 1990; Mizoguchi *et al.*, 1990; McBrayer *et al.*, 2007)。但目前尚未见对 AST-C 基因在家蚕脑组织的表达进行定位的文献报道。

家蚕脑组织基因芯片数据分析表明,尽管家蚕中都存在 AST-A, AST-B 及 AST-C 基因,但仅有 *AST-C* 在 5 龄第 7 天幼虫、化蛹第 1 天、化蛹第 3 天、化蛹第 5 天及化蛹第 7 天的家蚕脑组织中表达(Gan *et al.*, 2011)。为了进一步理解家蚕中 AST-C 的可能作用,本研究利用芯片数据和 RT-PCR 技术分析了 *AST-C* 在不同发育阶段家蚕脑组织及中枢神经系统(central nervous system, CNS)(不包括脑)的表达特征, 用全组织包埋原位杂交技术对 *AST-C* 在脑组织中的转录表达进行定位检测,并与 PTTH 进行比较分析,为 *AST-C* 的功能研究提供重要的线索。

1　材料与方法

1.1　供试材料

家蚕:为 p50 品系,由西南大学蚕基因库提供,喂饲新鲜桑叶,在温度为 24 ~ 26℃,相对湿度为 70% ~85%,光周期为 12L∶12D 的条件下饲养。

质粒和菌株: pGEM-T-easy vector 购买自 Promega 公司:大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存备用。

1.2　试剂

Trizol (Invitrogen 公司,上海);氯仿(重庆化学试剂总厂);异丙醇(重庆川东化工化学试剂厂);M-MLV 反转录试剂盒(Promega 公司,北京);无水乙醇(重庆化学试剂总厂);PCR 试剂盒(上海生工);PCR 地高辛标记探针合成试剂盒(PCR DIG Probe Synthesis Kit)(Roche 公司,德国);地高辛核酸检测试剂盒(DIG Nucleic Acid Detection Kit)(Roche 公司,德国);胶回收试剂盒 (TaKaRa 公司, 中国);PCR 产物回收试剂盒 (TaKaRa 公司,大连);抽提质粒试剂盒 (TaKaRa 公司,大连)。多聚甲醛(南京化学试剂有限公司);马来酸(湖北巨胜科技有限公司);染色剂 NBT/BCIP(北京赛驰生物科技有限公司); 焦碳酸二乙酯(上海生工);Tween-20(上海生工); 4% 多聚甲醛(多聚甲醛 20 g,250 mL 双蒸水);20 × SSC(pH 7)(3.0 mol/L 氯化钠,0.3 mol/L 柠檬酸钠);洗脱缓冲液(pH 7.5)(0.1 mol/L 马来酸,0.15 mol/L 氯化钠,0.3% Tween-20);马来酸缓冲液(pH 7.5)(0.1 mol/L 马来酸,0.15 mol/L 氯化钠);检测缓冲液(pH 9.5)(0.1 mol/L Tris-HCl,0.1 mol/L 氯化钠); 封阻溶液(pH 7.5)(0.1 mol/L 马来酸,0.15 mol/L 氯化钠, 1% 封阻剂);抗体溶液(抗地高辛抗体);染色液(染色剂 NBT/BCIP); DEPC 处理水(0.1% DEPC);PBT 缓冲液(PBS 缓冲液,0.1% Tween-20)。

1.3　家蚕芯片数据分析

基于家蚕芯片表达数据中的脑组织芯片表达数据(登录号: GSE25342),比较分析家蚕 *AST-C* 与 *PTTH* 在5 龄7 天幼虫(V7),化蛹第1 天(P1),化蛹第 3 天(P3),化蛹第 5 天(P5)及化蛹第 7 天(P7)的发育表达特征。

1.4　RT-PCR 反应

通过 RT-PCR,分析和比较家蚕5 龄第3 天幼虫(V3)、5 龄第 5 天幼虫(V5)、5 龄第 7 天幼虫(V7)、游走期蚕(熟蚕)(W)、化蛹第 1 天(P1)、化蛹第 3 天(P3)、化蛹第 5 天(P5)、化蛹第 7 天(P7) 时期家蚕脑与 CNS 中 AST-C 基因的表达。每个时期取约 30 头家蚕的脑及 CNS 在解剖镜下迅速分离,采用 Trizol 法进行 RNA 的提取,并利用 M-MLV 反转录酶

进行25 μL 体系反转录。反转录得到的 cDNA 利用内参引物(表1)进行扩增检测,反应条件:94℃预变性4 min;94℃变性40 s,55℃退火40 s,72℃延伸45 s,共25个循环;最后72℃终延伸10 min;12℃条件下保存。用于 *AST-C* 和 *PTTH* 表达谱分析及内参的引物信息见表1,引物采用 Primer Premier 5.0 软件进行设计,并由上海英骏有限责任公司合成。

表1 家蚕基因 cDNA 片段的扩增引物

Table 1 Oligonucleotide primers used to amplify cDNA fragment of genes in *Bombyx mori*

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	扩增产物大小(bp) Product size
AST-C	F: GTTTTGTTTGGGGTTTTTGC R: TCGTGTTATTCACTTGCGGA	57	354
AST-C-T7	F: GTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTTTGTTTGGGGTTTTTGC R: GTAATACGACTCACTATAGGGAGATCGTGTTATTCACTTGCGGA	57	378
PTTH	F: ACCCAGACACGAGCCCAG R: CACAAACACGCCACGCTG	59	367
PTTH-T7	F: GTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCCAGACACGAGCCCAG R: GTAATACGACTCACTATAGGGAGACACAAACACGCCACGCTG	59	391
Rpl3	F: TCGTCATCGTGGTAAGGTCAA R: TTTGTATCCTTTGCCCTTGGT	55	619

1.5 原位杂交

1.5.1 探针的制备:分别用引物 AST-C-F/AST-C-R 和 PTTH-F/PTTH-R(表1),以家蚕5龄第7天幼虫的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增目的基因片段。PCR 扩增程序如下:94℃ 4 min;94℃ 40 s,57/59℃ 40 s,72℃ 30 s,35个循环;72℃ 10 min;4℃保存备用。将上述 PCR 产物用1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,用溴化乙锭染色观察,并在紫外光下用消毒过的干净刀片切下含目的片段的胶条。按照 PCR 产物回收试剂盒上操作说明,回收目的片段,随之进行连接和转化。并进行阳性克隆质粒的提取及体外转录。最后进行探针的效率检测。

1.5.2 家蚕全包埋脑组织的制备:在解剖镜下取出5龄第7天家蚕幼虫脑组织,快速地用 PBS 进行洗涤之后,在4%的多聚甲醛溶液中4℃温度条件下固定过夜。随之在甲醇与 PBS 的比例分别为50%,75%,95%及100%的浓度条件下进行梯度脱水10 min。最后置于100%的甲醇中-20℃储存备用。

1.5.3 5龄第7天家蚕幼虫脑全组织包埋杂交:将保存备用的5龄第7天家蚕幼虫脑组织在室温条件下,在甲醇与 PBS 的比例(v/v)分别为95%,75%和50%的浓度条件下复水10 min;用 PBT 溶液简单洗涤后,在37℃的温度条件下用蛋白酶 K 消化10 min;在 PBT 溶液洗涤两次后,在4%的多聚甲醛溶液中4℃温度条件下固定20 min;用 PBT 溶液洗涤两次后,脑组织在54℃的条件下,杂交液中预杂交30 min;冻存的探针在80℃的条件下热变性5 min,在冰上冷却5 min后,按探针效率检测提供的相应的倍数用杂交液进行稀释,并在54℃的条件下孵育3 h;用54℃预热的杂交液洗涤组织2次,每次10 min;在杂交液:PBT 为1:1(v/v)的混合液中洗10 min,最后在 PBT 中洗10 min;在检测缓冲液:封阻液为9:1(v/v)的混合溶液中,室温条件下保温30 min;组织在抗体溶液中室温条件下保温4 h后,在 PBT 中洗涤10次;将组织在染色液中染色约20 min,然后用 PBT 冲洗。杂交完成的脑组织被放于甘油中,在双目显微镜下观察并拍照。在杂交过程中,体外转录合成的正义链探针作为对照组。

1.6 数据分析

基因的相对表达量采用芯片数据信号实际值以2为底取对数,并用 Microsoft Excel 作图。

2 结果

2.1 基于芯片数据比较 *AST-C* 与 *PTTH* 的发育表达分析

脑组织芯片发育表达特征显示,AST-C 基因与 PTTH 基因有相似的发育表达模式,在 V7 时期的家蚕脑组织高量表达,而当进入蛹期后表达下降(图1)。

2.2 *AST-C* 在家蚕脑组织及 CNS 中发育表达的 RT-PCR 分析

通过 RT-PCR 分析,比较 *AST-C* 在不同时期家蚕脑组织及 CNS 中的发育表达特征。结果显示,脑组织中 *AST-C* 基于 RT-PCR 的表达特征(图2)与芯片数据(图1)基本一致,都在化蛹前高量表达,进入

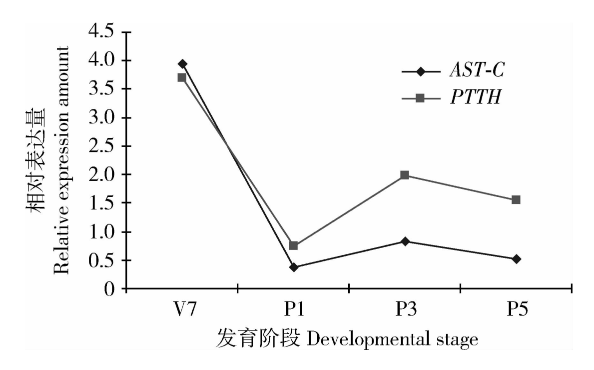


图1　家蚕脑组织芯片数据 *AST-C* 与 *PTTH* 基因发育表达特征

Fig. 1　Microarray-based *AST-C* and *PTTH* gene expression profiles in the brain of *Bombyx mori*

V7：5龄第7天幼虫 Day-7 5th instar larva；P1：化蛹第1天 1st day after pupation；P3：化蛹第3天 3rd day after pupation；P5：化蛹第5天 5th day after pupation. 图中数值为芯片信号实际值以2为底的对数字。The numerals in the figure represent the actual values on a log2 scale.

蛹期后降低，在蛹后期又上升。*AST-C* 基因在 CNS 中的表达模式与脑组织表达情况相似，表明脑组织中 *AST-C* 的表达模式与整个中枢神经系统的一致性（图2）。

2.3　*AST-C* 基因在家蚕脑组织中的表达定位

将分别克隆有家蚕 *AST-C* 和 *PTTH* 的 pMD18-T 重组质粒 DNA 作为模板，用含有 DIG-dNTP 成分的 PCR 地高辛标记探针合成试剂盒进行探针标记。将标记的探针进行7个浓度梯度的稀释，并取1 μL 进行标记效率测定，结果表明在200×稀释倍数以内2个被检测基因的杂交信号清楚。以其杂交信号清楚程度和稀释后总体积的综合考虑，选择100×稀释倍数，用于全脑组织包埋原位杂交实验。显微镜（放大倍数为10×40）下观察的结果显示，*AST-C* 在家蚕脑组织中一对外侧神经分泌细胞中表达（图3：B，C）。*AST-C* 阳性细胞的位置明显与 *PTTH* 相

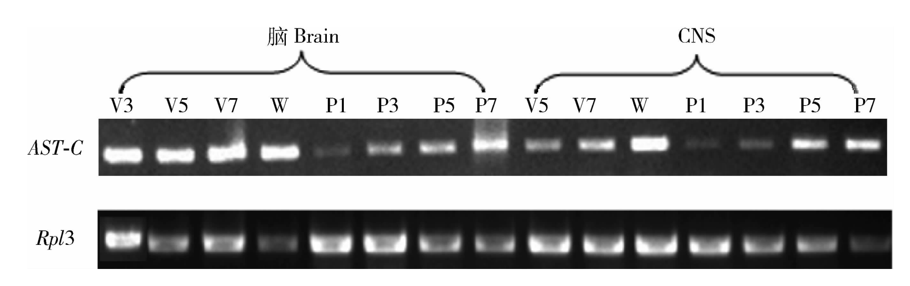


图2　*AST-C* 在家蚕脑组织和中枢神经系统中的发育表达特征

Fig. 2　Developmental expression profiles of *AST-C* genes in the brain and central nervous system (CNS) of *Bombyx mori*

M：DNA 分子量标准物 DNA Marker；V3：5龄第3天幼虫 Day-3 5th instar larva；V5：5龄第5天幼虫 Day-5 5th instar larva；V7：5龄第7天幼虫 Day-7 5th instar larva；W：游走期蚕 1st day after the beginning of wandering；P1：化蛹第1天 1st day after pupation；P3：化蛹第3天 3rd day after pupation；P5：化蛹第5天 5th day after pupation；P7：化蛹第7天 7th day after pupation. *Rpl3* 作内参。*Rpl3* gene was used as the internal control.

同（图3：E）。为了进一步证实 *AST-C* 与 *PTTH* 在家蚕脑组织表达的共位性，使用 *PTTH* 和 *AST-C* 探针的混合物进行原位杂交，杂交信号仍然定位于家蚕脑外侧对称的神经分泌细胞（图3：G，H）。

3　讨论

AST-C 是神经肽信号物质。基于家蚕脑组织芯片数据的提示，并鉴于基因表达模式与功能之间密切的相关性，本研究开展了神经肽基因 *AST-C* 在不同发育阶段家蚕脑组织和 CNS 的转录表达模式分析。并利用原位杂交技术对 *AST-C* 在家蚕脑组织的表达进行定位，通过与已知功能基因 *PTTH* 表达位点的比较，为家蚕未知基因 *AST-C* 的后期功能研究提供重要的线索。

脑是昆虫发育调控的中心，研究表明脑神经肽 PTTH 促进前胸腺合成和释放蜕皮激素（Gilbert *et al*., 2002）。除了 PTTH，脑也产生了其他影响前胸腺合成蜕皮激素的神经肽，如：Hua 等（1999）研究表明，家蚕脑抑前胸腺肽（prothoracicostaic peptide，PTSP）能抑制前胸腺释放蜕皮激素；之后，Yamanaka 等（2005）研究表明家蚕脑组织表达的肌动抑制神经肽（Bommo-myosuppressin，BMS）抑制了前胸腺的活性。因此，不难推测脑不仅产生促前胸腺因子，也产生抑前胸腺因子，共同调节发育过程中家蚕血淋巴蜕皮激素滴度复杂的模式。早期研究显示家蚕脑组织的外侧神经分泌细胞产生了促前胸腺激素 PTTH（Kawakami *et al*., 1990；Mizoguchi *et al*., 1990），我们的实验也证实了这一结果，并发现 *AST-C* 与 *PTTH* 在家蚕5龄第7天幼虫脑组织中的表达共位化。在果蝇中几个神经肽已经被定位到外侧神经分泌细胞。在果蝇脑组织，外侧神经分泌细胞产

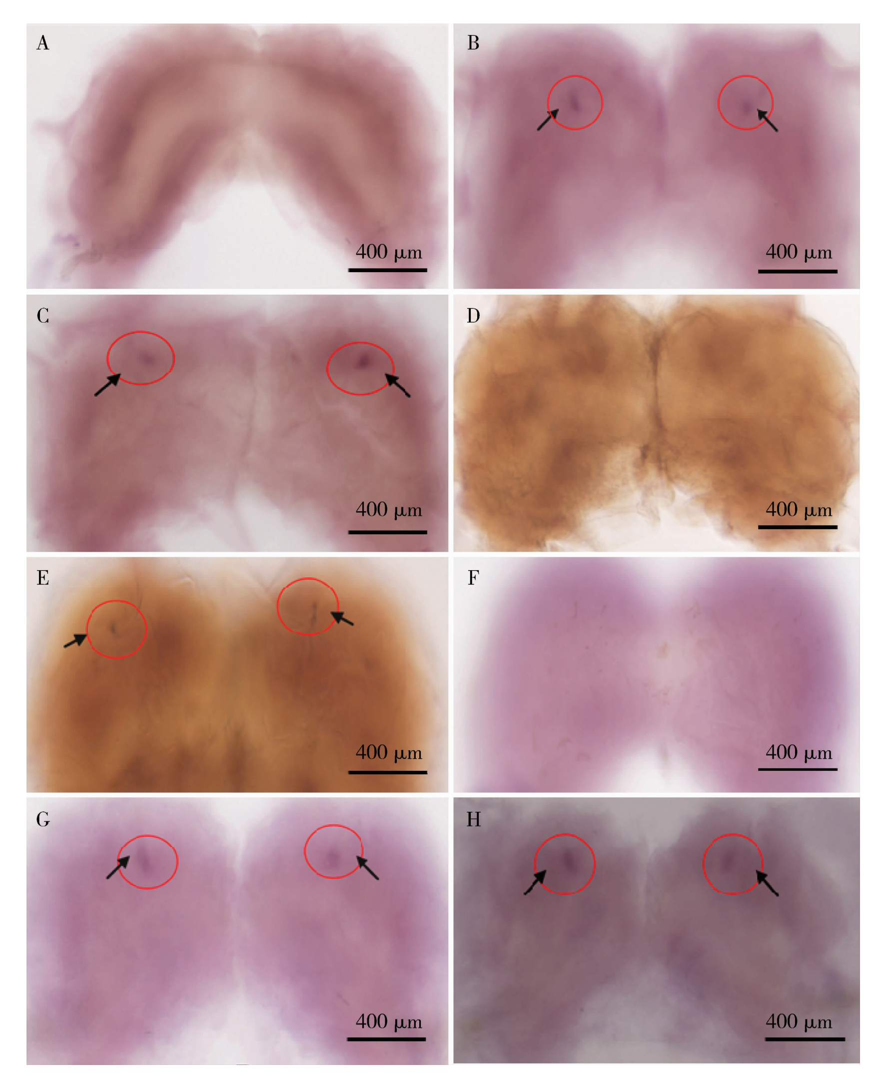


图 3 家蚕 *AST-C* 及 *PTTH* 在脑组织中的原位杂交

Fig. 3 *In situ* hybridization of *AST-C* and *PTTH* genes in the brain of *Bombyx mori*

A, D, F: 分别为 *PTTH*, *AST-C* 及 *PTTH* 和 *AST-C* 探针混合杂交的对照 The controls of *PTTH*, *AST-C* and the mixture of *PTTH* and *AST-C* hybridization, respectively; B, C : 箭头所指为 *AST-C* 探针杂交信号 The hybridization signal of *AST-C* as indicated by an arrow; E: 箭头所指为 *PTTH* 探针杂交信号 The hybridization signal of *PTTH* as indicated by an arrow; G, H: 箭头所指为 *AST-C* 与 *PTTH* 探针共同的杂交信号 The common hybridization signal of *AST-C* and *PTTH* as indicated by an arrow.

生了离子转运肽(ITP)、促前胸腺激素(PTTH)、黑化诱导神经肽(corazonin) 和短神经肽 F(sNPF)(Choi *et al*., 2005; McBrayer *et al*., 2007; Nässel *et al*., 2008; Park *et al*., 2008; Lee *et al*., 2008)。Proctolin 也被发现在果蝇脑侧面的神经分泌细胞中表达(与 Corazonin 共位化)(Taylor *et al*., 2004; Isaac *et al*., 2004)。此外,Hossain 等(2006)通过全组织包埋原位杂交和免疫组化研究表明,20E 结合的核受体 EcR-A 和 EcR-B1 也在家蚕产生 PTTH 的细胞(prothoracicotropic hormone produced cells, PTPCs),即外侧神经分泌细胞表达。根据已有的研究信息,我们发现在昆虫脑外侧神经分泌细胞表达的基因都直接或间接地与变态发育相关,因此推测 PTPCs 是昆虫从幼虫到蛹变态发育的主控细胞。如 EcR 直接转导 20E 的信号,从而控制了昆虫蜕皮和变态的许多生物学过程及发育过程(Riddiford *et al*., 2003)。Kim 等(2004)的研究显示 Corazonin 参与了蜕皮行为的协调作用。

尽管长期以来人们知道昆虫的变态发育依赖于蜕皮激素和保幼激素之间的相互协调,但对其调控因子之间如何协调以及呈怎样的表达调控模式知之甚少。本研究中家蚕神经肽基因 *AST-C* 也在 PTPCs 表达,而且在 5 龄第 7 天家蚕幼虫的脑组织中, PTPCs 是唯一表达 *AST-C* 的细胞。*AST-C* 与 *PTTH* 在脑组织中相似的发育表达模式及表达定位特征,暗示 AST-C 与 PTTH 可能以相同的表达模式共同参与

了变态发育调控。尽管 30 多年前 Agui 等（1979）首次在烟草天蛾脑外侧神经分泌细胞中证实了 PTTH 的分泌，后来相继在家蚕脑组织中也得到证实（Kawakami *et al*., 1990；Mizoguchi *et al*., 1990），在功能上确定了该神经肽参与生长发育调控的重要作用，但 PTTH 产生和释放的分子机制仍停留于早期的研究。因此，本研究对 *AST-C* 与 *PTTH* 转录表达模式的比较分析和在脑组织表达位点的共位化证据也将为 PTTH 调控的分子机制及功能研究提供新的线索。

参考文献（References）

Agui N, Granger NA, Gilbert LI, Bollenbacher WE, 1979. Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: *in vitro* assay of a single neurosecretory cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(11): 5694 – 5698.

Bendena WG, Donly BC, Fuse M, Lee E, Lange AB, Orchard I, Tobe SS, 1997. Molecular characterization of the inhibitory myotropic peptide leucomyosuppressin. *Peptides*, 18(1): 157 – 163.

Choi YJ, Lee G, Hall JC, Park JH, 2005. Comparative analysis of *corazonin*-encoding genes (*Crz*'s) in *Drosophila* species and functional insights into *Crz*-expressing neurons. *J. Comp. Neurol.*, 482(4): 372 – 385.

Duve H, Johnsen AH, Scott AG, Yu CG, Yagi KJ, Tobe SS, Thorpe A, 1993. Callatostatins: neuropeptides from the blowfly *Calliphora vomitoria* with sequence homology to cockroach allatostatins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2456 – 2460.

Gan L, Liu X, Xiang Z, He N, 2011. Microarray-based gene expression profiles of silkworm brain. *BMC Neurosci.*, 12: 8.

Gilbert LI, Rybczynski R, Warren JT, 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 883 – 916.

Hossain M, Shimizu S, Fujiwara H, Sakurai S, Iwami M, 2006. EcR expression in the prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells of the *Bombyx mori* brain: an indication of the master cells of insect metamorphosis. *FEBS Journal*, 273: 3861 – 3868.

Hua YJ, Tanaka Y, Nakamura K, Sakakibara M, Nagata S, Kataoka H, 1999. Identification of a prothoracicostatic peptide in the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 274(44): 31169 – 31173.

Isaac RE, Taylor CA, Hamasaka Y, Nässel DR, Shirras AD, 2004. Proctolin in the post-genomic era: new insights and challenges. *Invert. Neurosci.*, 5(2): 51 – 64.

Kawakami A, Kataoka H, Oka T, Mizoguchi A, Kimura-Kawakami M, Adachi T, Iwami M, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H, 1990. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*, 247(4948): 1333 – 1335.

Kim YJ, Spalovska-Valachova I, Cho KH, Zitnanova I, Park Y, Adams ME, Zitnan D, 2004. Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(17): 6704 – 6709.

Kramer SJ, Toschi A, Miller CA, Kataoka H, Quistad GB, Li JP, Carney RL, Schooley DA, 1991. Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(21): 9458 – 9462.

Lee G, Kim KM, Kikuno K, Wang Z, Choi YJ, Park JH, 2008. Developmental regulation and functions of the expression of the neuropeptide corazonin in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.*, 331(3): 659 – 673.

Lorenz MW, Kellner R, Hoffmann KH, 1995a. A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Biol. Chem.*, 270(36): 21103 – 21108.

Lorenz MW, Kellner R, Hoffmann KH, 1995b. Identification of two allatostatins from the cricket, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae): additional members of a family of neuropeptides inhibiting juvenile hormone biosynthesis. *Regul. Pept.*, 57(3): 227 – 236.

McBrayer Z, Ono H, Shimell M, Parvy JP, Beckstead RB, Warren JT, Thummel CS, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, O'Connor MB, 2007. Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev. Cell.*, 13(6): 857 – 871.

Mizoguchi A, Oka T, Kataoka H, Nagasawa H, Suzuki A, Ishizaki H, 1990. Immunohistochemical localization of prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the brain of *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, 32(6): 591 – 598.

Nässel DR, Enell LE, Santos JG, Wegener C, Johard HAD, 2008. A large population of diverse neurons in the *Drosophila* central nervous system expresses short neuropeptide F, suggesting multiple distributed peptide functions. *BMC Neurosci.*, 9: 90.

Park D, Veenstra JA, Park JH, Taghert PH, 2008. Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PLoS ONE*, 3(3): e1896.

Pratt GE, Farnsworth DE, Siegel NR, Fok KF, Feyereisen R, 1989. Identification of an allatostatin from adult *Diploptera punctata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163(3): 1243 – 1247.

Riddiford LM, Hiruma K, Zhou X, Nelson CA, 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33(12): 1327 – 1338.

Stay B, Tobe SS, 2007. The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans. *Annu. Rev. Entomol.*, 52: 277 – 299.

Taylor CAM, Winther AME, Siviter RJ, Shirras AD, Isaac RE, Nassel DR, 2004. Identification of a proctolin preprohormone gene (*Proct*) of *Drosophila melanogaster*: expression and predicted prohormone processing. *J. Neurobiol.*, 58(3): 379 – 391.

Veenstra JA, 2009. Allatostatin C and its paralog allatostatin double C: the arthropod somatostatins. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39(3): 161 – 170.

Woodhead AP, Stay B, Seidel SL, Khan MA, Tobe SS, 1989. Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 5997 – 6001.

Yamanaka N, Hua YJ, Mizoguchi A, Watanabe K, Niwa R, Tanaka Y, Kataoka H, 2005. Identification of a novel prothoracicostatic hormone and its receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14684 – 14690.

（责任编辑：袁德成）